

JP63088136

Publication Title:

PREVENTIVE FOR CANCERATION

Abstract:

Abstract of JP63088136

PURPOSE:To obtain a preventive for canceration caused by an N-nitroso compound and capable of essentially completely detoxicating carcinogenicity of a secondary amine, etc., by using hydrolyzed natural substance rich in proline and hydroxyproline and its thermal denaturation product as an active component.
CONSTITUTION:The objective preventive for canceration caused by an N-nitro compound is produced by using hydrolyzed and/or enzyme-digested natural substance rich in proline and hydroxyproline and its thermal denaturation product as an active component. A preventive for canceration having high safety can be produced at a low cost by the hydrolysis of collagen which is a natural substance rich in proline and hydroxyproline or of gelatin, casein, prolamine, etc., which is thermally denatured product of collagen. Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide

Courtesy of <http://v3.espacenet.com>

⑫ 公開特許公報(A)

昭63-88136

⑬ Int.Cl.⁴ 識別記号 庁内整理番号 ⑭ 公開 昭和63年(1988)4月19日
 A 61 K 37/18 ADU 8615-4C
 // A 61 K 37/12 8615-4C
 37/16 8615-4C 審査請求 未請求 発明の数 1 (全6頁)

⑮ 発明の名称 発癌予防剤

⑯ 特 願 昭61-230164

⑰ 出 願 昭61(1986)9月30日

⑱ 発 明 者 徳 植 信 行 神奈川県川崎市中原区上平間280番地7号 藤コーポ103号
 ⑲ 発 明 者 楠 慎 一 郎 東京都練馬区西大泉4丁目3番49号
 ⑳ 出 願 人 株式会社アドバンス 東京都中央区日本橋小舟町5番7号

明 細 書

1. 発明の名称

発癌予防剤

2. 特許請求の範囲

- (1) プロリン及びヒドロキシプロリン高含有天然物及びその熱変性物の加水分解及び／又は酵素消化物が有効成分であることを特徴とするN-ニトロソ化合物由来の発癌予防剤。

3. 発明の詳細な説明

本発明はN-ニトロソ化合物によって惹起される肝臓癌、胃癌等の発癌の予防剤に関する。

N-ニトロソジメチルアミン(NDMA)を典型とする各種N-ニトロソ化合物が微量で強力な発癌作用を有することは、今日、周知の通りである(H. Druckrey et al., Z. Krebsforsch., 69 103(1967); J. H. Hotchkiss et al., J. Assoc. Off. Anal. Chem., 64 1037(1981)及び

G. G. Gibson et al., "Safety Evaluation of Nitrostable Drug and Chemicals" Tayler and Francis Ltd., London, 1981等々)。更に、特に強力な発癌性を有するNDMA等のN-ニトロソアミン類は、野菜等の食品中に豊富に含まれている硝酸塩が体内で転換された亜硝酸塩及び同じく魚肉等に含有の脂肪族アミン類と胃等の体内臓器中で反応生成し、発癌因子と成り得るものであることも又、近時次第に解明されつつある(Correa, P et al., Lancet ii, 58-60(1975); Tannenbaum, S. R et al., Annals of New York Academy of Sciences 355 267-277(1980); Tannenbaum, S. R. et al., Canc. Lett. 14 131-136(1981)); D. H. Fine et al., Nature 265 753(1977)及びP. Schlag et al., Lancet, April, 5 727(1980), 等々)。

そこで、N-ニトロソアミン類の生体内生成を事前に防止することは、発癌リスクを減じる点で非常に意義深いと考えられる。

しかし、従来、このような食品あるいは薬剤

は存在しておらず、唯一、アスコルビン酸(ビタミンC)がニトロソアミン生成の予防に有効であるとされているが、物質として不安定であり、ビタミンであるが故に摂取量も単独では限定されるため、実用化に至っていない現状である。

本発明者らは、脂肪族二級アミンと亜硝酸塩から生成されるニトロソアミンを防止すべく、その予防物質を検索、アミノ酸の一種であり二級アミンでもあるプロリン及びヒドロキシプロリンが胃内条件下で脂肪族二級アミンに優先して亜硝酸塩と反応して非発癌性のニトロソプロリン(NPPO)を生成し、結果的に発癌性N-ニトロソ化合物の生体内生成を極めて効果的に阻害して反応混合物全体を実質的に無害化し得るものであることを、特開昭59-164718にて提出した。

本発明は、上記発明をさらに発展させ、プロリン及びヒドロキシプロリンを多量に含有する天然物であるコラーゲン及びその熱変性物すな

みん類及び亜硝酸塩含有溶液の癌原性を実質的に完全に無毒化する作用を有し、従ってN-ニトロソ化合物由来の発癌予防薬として予防医学的見地から極めて有用なものと言い得る。

尚、生成NPPOが癌原性を有さず、しかもその尿中排泄も略完全且つ速やかであることは既に報告されている通りである(Chu, C., & Magee, P. N., Cancer Res., 41 3653-3657(1981); Dailey, R. E. et al., Toxicol., 3 23-28(1975); Mirvish, S. S. et al., J. Natl. Inst., 64 1435-1442(1980)及びOhshima, H. & Bartsch, H., Cancer Res., 41 3658-3662(1981), 等)。

用法・用量

野菜等の食品より摂取された硝酸塩は口腔内等の微生物により亜硝酸塩に転化され、主として胃等に於いて摂取食品中成分であるアミン類と反応して癌原性物質を生成するとされている。本邦人にあっては食品からの硝酸塩摂取量は21

まちゼラチン、カゼイン、プロラミン等を加水分解することにより、安価でより安全性の高い発癌予防剤を提供するものである。

以下、本発明剤の原料、製造方法、薬理乃至生物学的作用、用法・用量、毒性等につき詳細に説明する。

原料

コラーゲン及びその熱変性物であるゼラチン、カゼイン、プロラミン等が使用される。

製造方法

上記原料をアミノ酸に分解して、本発明剤とするための方法としては、通常の方法に従い加水分解又は酵素による消化を行う。

加水分解法は実験例1において、その具体例を示す。

薬理乃至生物学的作用

後記各実験例に示す通り、本発明剤は二級ア

ミン8~408mg/日とされており且つ唾液中亜硝酸イオン濃度が数ppm~50ppm程度であること(Ishiwata, H. et al., Proceedings of the 3rd International Conference on Environmental Mutagens, Tokyo Sept. 21-27, 1981 page 571-575), 及び胃液中の亜硝酸塩濃度が0.1~数10μg/ml(P. Schlag et al., Lancet, April 5 727(1980))程度であることを考慮すると、本発明剤の用量はプロリンとして数100μg~数g/日・50kg体重、より好ましくは1mg~1g/日・50kg体重の範囲内であり、予防医学的観点からすれば実際上は50~500mg/日・50kg体重程度で十分な発癌予防効果を発現し得る。

因みに、NDMAの発癌最低量は約1ppmと評価されており、これはヒト体重50kg換算で50mgに相当する(M. Arai et al., Gann 70 549(1979), 等)。

他方、本発明剤は一般に経口投与されるものであるが、加水分解後の乾燥粉末をそのまま摂取しても、食品に添加して共に摂取しても良い。

又、その剤型としては水溶液剤、粉末剤、顆粒剤、錠剤、カプセル剤、徐放性マイクロカプセル剤等々、通常の剤型を精製デンプン末等の適当なキャリヤ、増量剤、希釈剤と共にあるいはこれらなしに単独に製剤して適宜選択実施され得る。

本発明剤は又、二級アミン類や硝酸塩含有率の高い食品を初めとして日常常用のしょう油、ソース、マヨネーズなどの調味料等の食品に予め添加、配合されて自然に摂取される形態をも取り得るので、より一層の予防効果を発揮し得る。

毒 性

原料に挙げたコラーゲン、カゼイン、プロラミン、ゼラチン等はすべて通常の食品に含まれるものであり、経口的には全然無毒性である。

因みにゼラチンを加水分解して得た本発明剤をICR系マウス(雄6週令、平均体重34.0±0.5g、各群10匹)に1mg、10mg、100mgの3段階

又、食品あるいは薬剤として摂取するに当り、安全性を第一に考えAmes法による変異原性試験を行ったところ、乾燥粉末1gあたり突然変異コロニー数が約2,000個出現した。通常、変異原性ありとされるのは数μg～数mgで数千～数万個のコロニー出現であり、変異原性としては問題ないが、より安全性を高めるため次の操作を行った。

この変異原性が加水分解時に生じた褐色のフミンによるものと考え、これを除去するために活性炭吸着法により試料2重量に対し活性炭1重量の割合で1時間攪拌吸着、濾過することにより、第1図に示すごとく濾液粉末の突然変異コロニー数は1g当り200個にまで減少した。又、第1表に示すようにプロリン、ヒドロキシプロリン含量はほとんど影響を受けず、性状は淡黄色粉末となり、味、臭い、溶解性には変化がなかった。

の試料(生理食塩水0.5ml溶解)を腹腔内に投与し、14日間観察し、Behrens-Kärber法に従って算出したLD₅₀値は830mg/kg体重以上であった。

次に、本発明剤を用いた実験例によって、本発明をより詳細に説明する。

実験例1 ゼラチンからの製造

水溶性ゼラチン(新田ゼラチン社製)を6N塩酸にて400g/l程度の溶液とし、110℃、5時間、蒸留還流法にて加水分解を行った。加水分解後の溶液はロータリーエバポレーターで減圧下50℃で1時間処理し、さらに残存塩酸は4規定水酸化ナトリウムで中和した。

生成した塩化ナトリウムは電気透析法(2人、1時間)で脱塩した。脱塩液は直ちに凍結乾燥あるいはスプレードライ法により粉末とした。又、生成した粉末のプロリン含量は10%であり、性状は褐色のやや甘味のある無臭粉末で、極めて水に易溶であった。

第1表

アミノ酸名	吸着前	吸着後
プロリン	10.5	11.2
ヒドロキシプロリン	7.8	7.0

実験例2 活性炭吸着乾燥粉末による毒性試験

変異原性の解消された乾燥粉末による90日間の亜急性毒性試験を行った。

ICR系マウス及びウィスターラット(共に4週令、雄)を用いて、マウスは1群20匹、ラットは1群10匹とし、各々にkg体重当り乾燥粉末を20mg、200mg、2gとなるよう飲料水に混ぜて毎日投与し、90日間観察した結果、マウス・ラット共に死亡例は全く見られず、体重増加、臓器重量等もコントロール群との間に差は認められなかった。

実験例3 本発明剤の効果

反応液作製法

① ジメチルニトロソアミン生成反応液

塩酸ジメチルアミン…ジメチルアミン換算量として69mg/mlの液を調製し、その0.75mlを用いた。

亜硝酸ナトリウム…106mg/mlの液を調製し、その0.75mlを用いた。

上記二者を、concHClにてpH3.4とし、さらに蒸留水適量を加えて、3ml反応液とした。

② 本発明剤添加反応液

塩酸ジメチルアミン、亜硝酸ナトリウム、いずれも上記処方液を各々用いた。

プロリン含有量が93mg/mlの液を調製し、ジメチルアミンに対して1モル等量となるように添加した。

プロリン添加の際は、ジメチルアミンとプロリンを混合後、亜硝酸ナトリウムを加え

てconcHClにてpHを3.4とし蒸留水適量を加え反応液とした。各々を密栓・遮光し、37℃、3時間インキュベートする胃内条件を設定した。

1) Amesテスト

本発明剤のアミンと亜硝酸塩より生成されるニトロソアミンの変異原性抑制効果をAmes法により測定した。ニトロソアミンはプレート当り0.5, 1, 1.5, 2mgとなるように調製し、本発明剤は1モル等量添加とした。

第2図にその結果を復帰コロニー数として示したが、Aはニトロソアミン生成反応液であり、Bは本発明剤添加反応液である。

2) ラット肝臓NAD量

発癌物質投与によるDNAの損傷に対して、臓器中のNAD量が減少し、臓器特異性のあることが報告された〔坂本ら., 1981年度 日本変異原学会〕。

そこで、ジメチルニトロソアミンの肝臓特異性に注目して以下の実験を行った。

ウィスター系雄ラット(5週令)を1群3匹とし、各試験において1群を無処理のコントロール群とした。

動物100g当り0.1mlの投与量としてゾンデにより経口投与を行った。

各反応液投与群は投与10時間後に断頭により屠殺し、充分瀉血後、直ちに開腹して肝臓の摘出を行い、1匹につき肝臓を約1gを正確に秤量して4検体とし、部分的な測定誤差を出来る限り少なくするようにした。検体は直ちに凍結させた。

NAD量測定法

Methods of Enzymatic Analysis., Vol 4, 2045(1974)に準拠したエタノールを基質としたADH(アルコール・デヒドロゲナーゼ、1.2mg/ml)を用いる酵素法により測定を行った。すな

わち、秤量後、凍結した検体を凍結した状態でホモゲナイズし、これに5mlの0.6N-HClO₄を加えて除蛋白する。そのサンプルを3,000rpm 5分間遠心分離し上清を得、さらに1M-K₂HPO₄を上清1mlにつき0.2ml加え、3N-KOHにてpHを7.0~7.4の中性に調製する。これをさらに3,000rpm 5分間遠心分離して、KClO₄の沈澱を除いた上清1mlを得、0.1M-ピロリン酸ナトリウム・塩酸セミカルバジッドバッファ-(pH 8.8)1mlを加え、エタノール10μlを添加して攪拌後、340nmにおけるO.D.を測定(E₁)する。さらにADHを10μl加えて同様にO.D.を測定(E₂)、E₂-E₁の差(ΔE_{340nm})を求め、既知の算出法により肝臓1g当りのNAD量(μmole)を求めた。

結果は第3図に示したが、図中Aはコントロール、Bはニトロソアミン生成反応液、Cは本発明剤添加反応液、Dは本発明剤のみの投与群である。

これより本発明剤は、ニトロソアミンによる

NAD量の減少を顕著に抑制することがわかる。

3) 抗胎盤性グルタチオン-S-トランスフェラーゼ(GST-P)抗体陽性細胞巣を指標とした効果

発癌物質投与により早期に出現するGST-P抗体染色陽性細胞巣が一般に肝の前癌病変として考えられることから、F-344フィッシャーラット(雄4週令群5匹)を用いて第4図に示すような発癌の2段階説を利用した、肝を標的とする実験系を応用し、実験開始時にイニシエーターとしてジエチルニトロソアミン(DEN)を50mg/kg1回腹腔投与し、2週後から被検物質としてジメチルアミンのみ、及びアミンと当該作製物を飲料水に、亜硝酸ナトリウムを飼料に混ぜて自由摂取させ、その1週後に2/3肝部分切除(partial hepatectomy: PH)を施し、さらにその後7週にわたり前記飲料水及び飼料を自由摂取させて被検物質投与8週目に屠殺剖検し、

肝についてGST-P抗体染色標本を作製し、染色陽性細胞巣について面積及び細胞数について画像処理装置を用いて画像解析を行った結果、第2表に示すごとく面積、細胞数共にメチルアミン及び亜硝酸ナトリウム摂取群はコントロール群に比べて高値を示し、当該作製物を添加した群は有意な抑制効果を示した。

実験系は第4図に模式図で示したが、図中Aはコントロール群、Bはアミン+亜硝酸摂取群、Cは本発明剤添加群である。

第2表

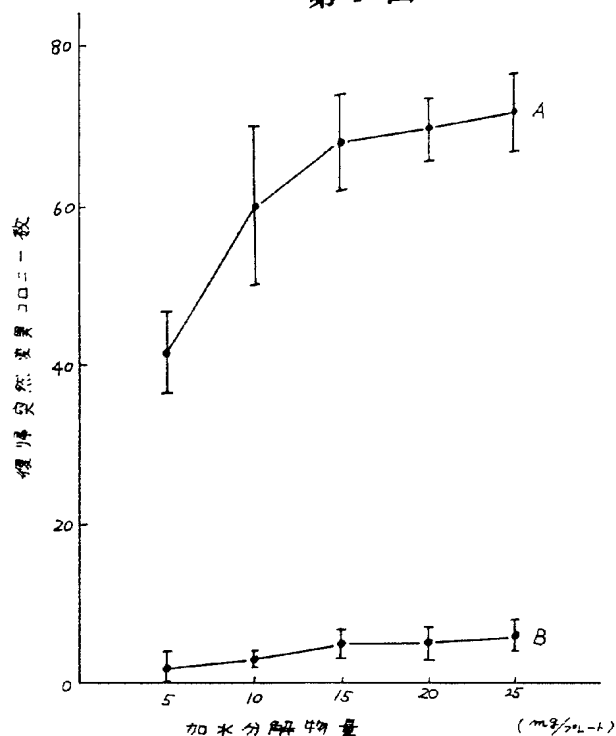
群	面積(mm ²)	細胞数(個)
A コントロール(D及びPH実施)	3,805±108	286±16
B アミン+亜硝酸投与	5,530±590	580±115
C アミン+亜硝酸+本発明剤(1モル等量)投与	4,350±430	390±39
当該作製物による抑制率	68%	65%

4. 図面の簡単な説明

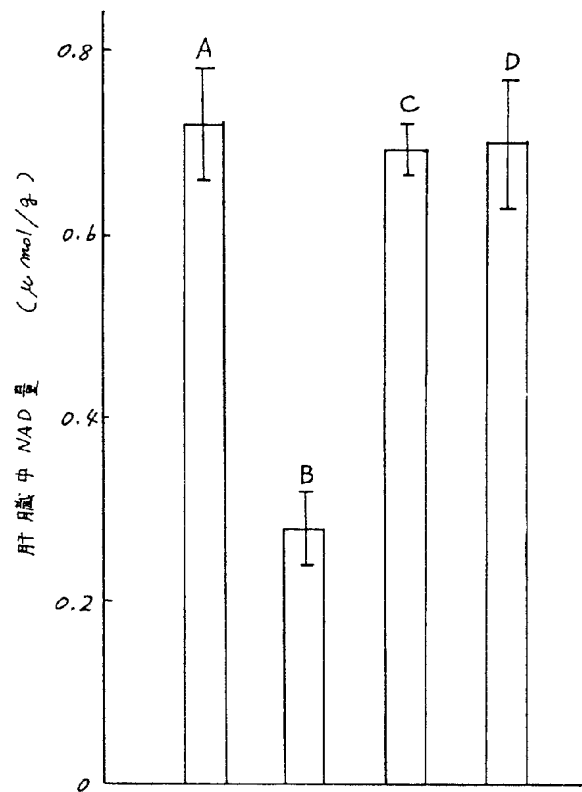
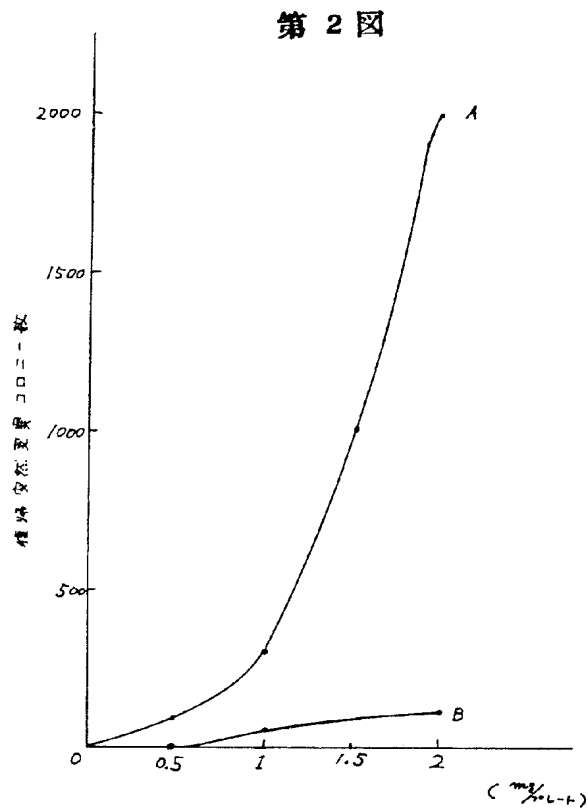
第1図乃至第4図は、実験例1, 3-1), 3-2), 3-3)の説明図である。

特許出願人 株式会社アドバンス開発研究所

第1図



第 3 図



第 4 図

